

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-324046

(43) 公開日 平成6年(1994)11月25日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/574	Z	8310-2 J		
33/53	D	8310-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平6-71308	(71) 出願人	591038141 寶酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地
(22) 出願日	平成6年(1994)3月17日	(72) 発明者	片山 政彦 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造 株式会社中央研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平5-82506	(72) 発明者	平井 小百合 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造 株式会社中央研究所内
(32) 優先日	平5(1993)3月18日	(72) 発明者	加藤 郁之進 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造 株式会社中央研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 中本 宏 (外2名)

(54) 【発明の名称】 悪性腫瘍の検出方法及びキット

(57) 【要約】

【目的】 体液可溶性Eカドヘリン量を測定することにより悪性腫瘍を検出する方法、及びキットを提供する。

【構成】 体液中の体液可溶性Eカドヘリン量を測定し、その値を健常値と比較する悪性腫瘍の検出方法。体液可溶性Eカドヘリンに反応性を有する抗体を含有する、上記検出方法を実施するための悪性腫瘍検出用キット。体液の例には血清、血漿、及び尿がある。

【効果】 悪性腫瘍の検出を迅速、簡便に行うことができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液中の体液可溶性Eカドヘリン量を測定し、その値を健常値と比較することを特徴とする悪性腫瘍の検出方法。

【請求項2】 体液可溶性Eカドヘリンに反応性を有する抗体を用いて体液可溶性Eカドヘリン量を測定する請求項1記載の方法。

【請求項3】 体液として血清、血漿、又は尿を用いる請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 体液中の体液可溶性Eカドヘリン量を測定し、その値を健常値と比較することによって悪性腫瘍の検出を行うためのキットであって、体液可溶性Eカドヘリンに反応性を有する抗体を含有することを特徴とする悪性腫瘍検出用キット。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は悪性腫瘍の検出方法及び検出用キットに関する。

【0002】

【従来の技術】カドヘリンは分子量約10万前後の膜貫通ドメインを持つ細胞膜表面分子であり、細胞-細胞間の接着に関して、共存するCa<sup>2+</sup>イオン依存的に機能を発揮するタンパク質である。現在までカドヘリンには数多く分子種が発見されており、その中でも最も古くに単離同定された分子種としてEカドヘリン、Nカドヘリン、Pカドヘリンの3種がよく知られている。これらの3種の分子種はそれぞれ同一分子種同志のみが選択的に結合する性質を示すことが知られており、これらの同質結合機構がカドヘリン族の特徴の1つと考えられている。これらのカドヘリン分子種は、特に生命体の発生と分化の過程で組織構築に働く重要な細胞間接着分子であることが知られており、神経組織や心臓や胎盤といった生体内の特定の臓器にそれぞれ一定の分子種が主に分布していることが多く、それぞれの組織の形成に細胞接着機能を発揮していると考えられている〔M. タケイチ (M. Takeichi)、サイエンス (Science)、第251巻、第1451～1455頁 (1991)〕。これら代表的3種のカドヘリンのうち、Eカドヘリンはヒトやマウスなどにおいて上皮細胞や上皮組織に主に発現する分子であり、免疫組織染色法などを用いて様々な疾患の組織中の局在などが調べられている〔Y. シモヤマ (Y. Shimoyama)ら、キャンサー・リサーチ (Cancer Research)、第49巻、第2128～2133頁 (1989)〕。それらの検討の結果から、特に悪性腫瘍組織においてEカドヘリン発現量が減少している現象が数多く見出されている。また、動物実験においても、悪性腫瘍細胞株のうちEカドヘリン発現量が多く細胞間接着が強い株に比べて、Eカドヘリン発現量が少なく細胞間接着が弱い株の方が悪性度が高く、高い確率で転移病巣を形成する傾向が見出されている〔U. H. フリクセン (U. H. Friksen)ら、ジャーナル・オブ・セルバイオロジー (Journal of Cell Biology)、第113巻、第173～185頁 (1991)〕。これらの結果から、細胞表面に

に表示しているEカドヘリンの量と悪性腫瘍の転移性能や悪性度の間には、密接な関連があると推測されている。

【0003】また一方では、本質的に膜貫通領域を分子内部に有するカドヘリンは界面活性剤などを含む溶媒中においてのみ可溶化する性質を持ち、また、界面活性剤を含まない溶媒中においては細胞抽出液などにおいてカドヘリン分子の細胞外領域の一部が極めてプロテアーゼにより切断され易く、切り出された分子量8万前後の低分子カドヘリン分解断片は界面活性剤などを含まない水系溶媒中で可溶化状態で存在できることが既に知られている〔M. J. フィーロック (M. J. Wheelock)ら、ジャーナル・オブ・セルラー・バイオケミストリー (Journal of Cellular Biochemistry)、第34巻、第187～202頁 (1987)〕。しかしながら、プロテアーゼにより生じるカドヘリン分解物がヒトや動物などの生体液中に存在することは従来全く知られていなかった。また、このことは従来カドヘリン分解物を主要な構成分子とする可溶性カドヘリンの溶液中濃度を測定し、含有量を算出する技術が存在しなかったことにも起因する。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】また、古くから解析されてきた細胞上のEカドヘリン発現量と悪性腫瘍などの疾患との関連についても従来Eカドヘリン検出技術として用いられてきた抗体による組織化学的検出法やフローサイトメトリーやウエスタンブロットング法や免疫沈降法などの方法はいずれも定性的方法によるものであり、患者などからの組織生検材料の採取に危険が伴ったり、試薬や機器の準備などに時間がかかるなどの点において、実際に疾患の診断などの臨床的応用が極めて難しいものであった。本発明の目的は体液可溶性Eカドヘリンを簡便に定量する方法を確立し、該方法を用いて悪性腫瘍を検出する方法及びキットを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は悪性腫瘍の検出方法に関し、体液可溶性Eカドヘリン量を測定し、その値を健常値と比較することを特徴とする。また本発明の第2の発明は悪性腫瘍検出用キットに関し、体液中の体液可溶性Eカドヘリン量を測定し、その値を健常値と比較することによって悪性腫瘍の検出を行うためのキットであって、体液可溶性Eカドヘリンに反応性を有する抗体を含有することを特徴とする。

【0006】本発明者らは以上述べられた従来技術の問題点を考慮し、体液可溶性Eカドヘリンの溶液中微量濃度を簡便に測定する方法を確立し、その測定法によりヒト及び動物の体液中に体液可溶性Eカドヘリンが一定量

存在していることを見出し、その体液可溶性Eカドヘリン量が宿主の疾患、特に悪性腫瘍において有意に上昇する現象を見出し、本発明を完成するに至った。また、本発明の方法に用いるための試薬類をまとめてキット化し、より簡便な測定を可能にした。

【0007】本発明において測定対象となる体液可溶性Eカドヘリンとは、可溶性で体液中に存在するEカドヘリンの分解物あるいは非分解物などEカドヘリン分子に由来するすべての分子を含み、それらは主に分子量8万前後のEカドヘリン分解物により構成される。

【0008】本発明における体液可溶性Eカドヘリンの測定方法としては例えば体液可溶性Eカドヘリンに反応性を有する抗体を用いる方法が挙げられる。該方法の例としてはエンザイムイムノアッセイ(EIA)、ラジオイムノアッセイ、フルオロイムノアッセイ、免疫比濁法、ラテックス凝集法など体液可溶性Eカドヘリンを測定できる方法であれば何でもよいが、操作が簡便であることから特にEIAが望ましい。

【0009】体液可溶性Eカドヘリンに反応性を有する抗体としては、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれでもよく、また抗体由来動物もマウス、ラット、ウサギなど一般に実験動物として用いられる動物のうちいずれを使用してもよいが、抗原に対する特異的反応性が確実であり大量製造が容易であることからマウス由来モノクローナル抗体を使用することが特に望ましい。マウス由来モノクローナル抗体の例としてはHECD-1(宝酒造社製)、SHE78-7(宝酒造社製)といった市販品のほか、本発明者らが新たに作製したSHE13-6、SHE3-10が挙げられる。これら4種のモノクローナル抗体はEカドヘリン分子上の互いに異なる部位を認識するので任意の組合せでEIA系を構築することができる。例えば、HECD-1とSHE3-10の組合せ、SHE78-7とSHE3-10の組合せでEIA系を構築することができる。また、SHE13-6は体液可溶性Eカドヘリンに対して強い反応性を示し、細胞上の非断片化Eカドヘリンには弱い反応性しか示さない。したがって、SHE13-6を使用することにより、より均一に体液試料中の体液可溶性Eカドヘリンを測定することが可能である。これらの抗体は当業者において公知の技術により適宜に断片化、標識化、固定化、修飾化などの処理が施されていてもよい。

【0010】本発明に使用する体液としては、血清、血漿、尿、髄液、羊水、腹水、リンパ液など通常の体外診断医療において採取されうる試料すべてを含み、組織や細胞の溶媒などによる洗浄液や抽出液も含むものとするが、特に頻繁に用いられ採取が簡便であることから血清と尿が好ましい。

【0011】本発明者らは、体液可溶性Eカドヘリン測定法としてサンドイッチタイプEIAを、体液可溶性Eカドヘリンに反応性を有する2種の異なるモノクローナ

ル抗体の一方をマイクロプレートなどの固相に吸着し、他方をパーオキシダーゼ酵素で標識して、両者を組合せることにより初めて確立することに成功した。この体液可溶性Eカドヘリン測定EIA法は、数ng/mlという低い濃度の溶液中の体液可溶性Eカドヘリンの定量が可能であり、従来この種の体液可溶性Eカドヘリン測定法は報告されていない。また、本発明者らはこの体液可溶性Eカドヘリン測定EIAを用いて、健康ヒト成人の血清、血漿、及び尿中に数ng/mlから数μg/mlの範囲で体液可溶性Eカドヘリンが検出されうることを見出した。従来、ヒト又は動物由来のこの種の体液中に体液可溶性Eカドヘリンが存在するという事実は見出されていなかった。

【0012】更に、本発明者らはこれらの発明を発展させ、数十名の疾患患者の体液中の体液可溶性Eカドヘリン量の分布と数十名の健康人体液中の体液可溶性Eカドヘリン量の分布を比較し、統計的に解析し、悪性腫瘍患者において有意にその値が上昇する現象を見出し、腫瘍マーカーとして病気の診断や病状の把握などに極めて有用であることを見出した。そして、血清を体液試料として用いることができることを示すと共に、更に採取が簡便な尿を体液試料として用いることも可能であることを示した。この様に体液可溶性Eカドヘリンを簡便な体液中に存在する腫瘍マーカーとして用いた報告例は過去にない。

【0013】また、本発明の方法に用いる固相化抗体液、標識抗体液、標準品溶液、基質溶液などの試薬類をまとめてキットとしておくことにより、より簡便に体液可溶性Eカドヘリン測定を行うことができる。なお、キットに含める試薬は溶液状でもよいし凍結乾燥品でもよい。

【0014】以上詳細に説明したように、本発明により従来不可能であった体液中の体液可溶性Eカドヘリンの微量測定が可能となり、血清や尿といった一般臨床検査に用いられる体液を使用して従来存在しない新規な腫瘍マーカーによる疾患のモニターが可能となった。

【0015】

【実施例】本発明を実施例をもって更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0016】実施例1

(1) 免疫原の調製

健康妊婦より分べん時に採取された胎盤を、20mMトリス生理緩衝食塩水(150mM NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、2mM NEM、0.3mM PMSF、0.2% NaN<sub>3</sub>を含む、pH7.6)(以下TBSと略す)にて5回洗浄し付着している血液を除去した。洗浄した胎盤500gをTBS1リットルと共にホモジナイザー中にて細片化した。十分に細片化した後に高速遠心分離により抽出液上清と不溶物とを分離した(2000g×3

0分間)。次いで、抗ヒトEカドヘリンマウスモノクローナル抗体HECD-1(宝酒造社製)10mgをブロムシアン活性化セファロース(ファルマシア社製)2gに吸着させ、HECD-1抗体固定化セファロースを調製した。調製したHECD-1抗体ゲルをガラスカラムに充てんさせ、TBSにてよくカラムを洗浄した。引き続き先に調製した胎盤抽出上清液を本カラムに流し、その後TBS1リットルにて十分にカラムを洗浄した。カラムを洗浄した後に、8M尿素を含有するTBSにて抗体カラムに吸着した抗原物質を溶出した。溶出されたタンパク質溶液を透析チューブに入れて、1晩4℃条件下にてTBS5リットル中で透析した。透析により完全に尿素を除去した後に、この溶出タンパク質溶液を再び前記のHECD-1抗体固定化カラムに流し、前記と同様な操作により、抗体カラムより抗原物質を溶出した。溶出液をコロジオンパック(ザルトリウス社製)によりタンパク質濃度1mg/ml程度に濃縮し、2mM CaCl<sub>2</sub>を含む生理食塩水5リットルに対して1晩4℃条件下にて透析処理した。得られたタンパク質溶液は、抗ヒトEカドヘリンマウスモノクローナル抗体であるHECD-1に強く反応する抗原物質を主に含んでおり、該抗原物質は主としてヒトEカドヘリン分解物により構成される(以後、このタンパク質抗原を、標準Eカドヘリンと称する)。この標準Eカドヘリンを500μgずつにチューブに分注し、-80℃以下の条件で免疫原あるいは標準物質として使用する時まで凍結保存した。

#### 【0017】(2)モノクローナル抗体の作製

実施例1-(1)で取得された標準Eカドヘリン500μgをフロイント・コンプリート・アジュバント(ディフコ社製)と等量混合し、6週令Balb/cマウス5匹(日本クレア社製)の腹腔内に等分して投与した。4週間後に標準Eカドヘリン500μgをリビアジュバントTDM(リビ社製)と等量混合し、既免疫マウス5匹に再び等分して腹腔内投与した。更に4週間後後者の投与操作を再度同マウス5匹に実施した。その3日後に、そのうちの2匹のマウスから脾臓を摘出し、ケラーとミルシュタインらの方法に従って細胞融合を行い、ハイブリドーマ細胞を作製した。標準Eカドヘリンを抗原として使用し、ELISA法により標準Eカドヘリンに反応性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択した。すなわち、標準EカドヘリンをTBS中にて希釈して終濃度10μg/mlとなる溶液を調製し、96穴マイクロプレート(ヌンク社)に適量分注し、そのまま4℃にて24時間静置したのちにプレート中の溶液をすべて廃棄し、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(以下BSA/PBSと称する)をプレートに満たし、37℃条件下にて1時間静置した。その後、プレート中の溶液をすべて廃棄しリン酸緩衝生理食塩水(以下PBSと称する)にて2回プレートを洗浄し、上記のごとく作製されたすべてのハイブリドーマ細

胞の培養上清をそれぞれプレートの各穴に添加した。そのまま室温にて1時間プレートを静置した後にPBSにて3回洗浄した。次いで抗マウスIgGパーオキシダーゼ標識抗体液(カッペル社製)をBSA/PBSにて適当に希釈した溶液をプレートの各穴に適量ずつ添加した。再びそのまま室温にて1時間プレートを静置した後に、PBSにて3回プレートを洗浄し、残液を十分に取除いた。ABTS基質液(アマシャム社製)を使用説明書に従って調製し、洗浄終了後のプレートの各穴に適量ずつ添加し、室温にて15分間静置した。その後、この96穴マイクロプレートをプレートリーダー(フロウ社製)にかけ、各穴の発色を波長410nmの吸光度として算出し、バックグラウンドに比較して強い発色が得られているハイブリドーマ細胞株を選択した。この様にして、標準Eカドヘリンを抗原として強い抗原抗体反応を起こす抗体を産生する株細胞として19株を選別した。これら19株のハイブリドーマ細胞に対して2回の限界希釈クロニングを実施し、再び上記ELISA法によるスクリーニングを行い、最も適切なハイブリドーマ細胞クローン株2株を最終選択し、これらの細胞が産生するモノクローナル抗体をそれぞれSHE13-6、SHE3-10と命名した。SHE13-6、SHE3-10は、HECD-1、SHE78-7と同様にEカドヘリンを産生することが既に知られているヒト皮膚ガン細胞A431表面に強く反応することを間接酵素抗体染色法により確認した。しかしながら、A431細胞表面を生理食塩水等で十分に洗浄し、残留している可溶性Eカドヘリンを細胞表層から除去した後にこれらの抗体の細胞表面Eカドヘリンへの反応を間接酵素抗体染色法により調査したところ、SHE13-6はA431細胞表面には弱い反応しか示さないことが確かめられた。

【0018】そして、SHE13-6、SHE3-10はHECD-1、SHE78-7と同様にEカドヘリンを産生せずNカドヘリンを産生することが知られているHeLa細胞表面に全く反応しないことをやはり同様な間接酵素抗体染色法により確認した。更に、SHE13-6、SHE3-10は標準Eカドヘリンを適当量SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、ニトロセルロース膜に電気的に転写した物を用いたウェスタンブロット法により、HECD-1、SHE78-7と同様に分子量約8万のタンパク質に反応することを確認した。

【0019】また、カドヘリン族に共通する性質として、カドヘリンを発現している培養細胞などをトリプシンなどのタンパク質分解酵素によって分散させる際に、2~10mMカルシウムイオン共存下ではカドヘリンは分解されずそのままの分子の形を保って残存するが、2~10mMEDTA共存下などのカルシウムイオン不在条件下ではカドヘリンは分解されてしまい分子が消失するという現象が確認されている(M. タケイチ (M. Take

ichi)ら、デベロップメンタル・バイオロジー (Developmental Biology)、第87巻、第340~350頁(1981))。SHE13-6は、10mM  $\text{CaCl}_2$ を含む0.02%トリプシン溶液(フロウ社製)処理A431細胞抽出液中の分子量約10万のEカドヘリンに弱い反応性を示し、10mM EDTAを含む0.02%トリプシン溶液(フロウ社製)処理A431細胞抽出液中のいかなる物にも反応しないことを、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法及びウェスタンブロット法により確認した。

【0020】SHE3-10は、HECD-1、SHE78-7と同様に10mM  $\text{CaCl}_2$ を含む0.02%トリプシン溶液処理A431細胞抽出液中の分子量約10万のEカドヘリンに強い反応性を示し、10mM EDTAを含む0.02%トリプシン溶液処理A431細胞抽出液中のいかなる物にも反応しないことを、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法及びウェスタンブロット法により確認した。また、SHE3-10は分子量約8万のヒト胎盤由来可溶性Eカドヘリンに対して、SHE13-6と同等な反応性を有することをELISA法により確認した。更に、SHE3-10はその表面を十分に洗浄したA431細胞表面に強い反応性を示し、SHE13-6は弱い反応性を示すことをイムノフローサイトメトリー法により確認した。

【0021】これらの結果から、SHE13-6、SHE3-10は、HECD-1、SHE78-7と同様に標準Eカドヘリンに反応性を有するマウスモノクローナル抗体であるとの確証を得た。該SHE13-6産生ハイブリドマをHybridoma SHE13-6と表示、命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した(FERM P-13389)。また、該SHE3-10産生ハイブリドマを、Hybridoma SHE3-10と表示、命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した(FERM P-14144)。

【0022】(3)モノクローナル抗体の特異性の確認 Hybridoma SHE13-6(FERM P-13389)を、プリステン(和光純薬社製)をあらかじめ投与したBalb/cマウス10週令(日本クレア社製)腹腔内で大量に増殖させ、投与後約10日経過した時点でマウスより腹水を採集し、硫酸塩析法又はイオン交換クロマトグラフィーなど一般に抗体精製によく用いられる方法により精製を行い、精製SHE13-6を得た。SHE13-6を過ヨウ素酸法によりパーオキシダーゼ(ペーリンガー・マンハイム社製)にて標識した。標識Eカドヘリンを吸着した96穴マイクロプレート(固相として、SHE3-10、SHE78-7、又はHECD-1を吸着抗原に反応させることによって、その用量依存的に前述の酵素標識SHE13-6の吸着抗原への結合が阻害されるかどうかをELISA法により調査したところ、両者の抗体間には全くそのような競合阻害性が見出されなかった。すなわち、SHE13-6は、他の3種の抗体、すなわちSH

E3-10、SHE78-7、及びHECD-1の標準Eカドヘリン抗原への結合に競合せず、したがってEカドヘリン分子上のSHE3-10、SHE78-7、及びHECD-1の認識部位とは異なる部位を認識することを確認した。Hybridoma SHE3-10(FERM P-14144)より調製した精製SHE3-10、及び前出のSHE78-7についてもそれぞれ同様な検討を行い、いずれも自身を除く他の3種のモノクローナル抗体と抗原結合に関して競合しないことを確認した。よって、SHE13-6、SHE3-10、SHE78-7、及びHECD-1はいずれもEカドヘリン分子上の異なる部位を認識することを確認した。

【0023】(4)サンドイッチEIA系の構築 HECD-1とSHE13-6をそれぞれ固相化抗体、酵素標識抗体としてサンドイッチEIAを構築した。まずPBSにて終濃度1mg/mlのHECD-1を含む溶液を調製し、アジ化ナトリウムを終濃度0.1%となるように添加し、固相抗体液を調製する。該固相抗体液をコーティングバッファー(0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS)にて100倍に希釈した終濃度10 $\mu\text{g/ml}$ の抗体溶液を、96穴マイクロプレート(モジュールプレートF-16、ヌンク社)の各穴に200 $\mu\text{l}$ ずつ添加し、密封して4℃で24時間静置する。次に、プレートから溶液を捨て、ブロッキング液(0.1%アジ化ナトリウムを含むBSA/PBS)をプレートの各穴に200 $\mu\text{l}$ ずつ添加し、密封して37℃で1時間静置する。プレートをPBSにて2回洗浄し、測定試料又は標準Eカドヘリンを800、400、200、100、50、0ng/ml含有する標準品溶液をプレートの各穴に100 $\mu\text{l}$ ずつ添加する。そのまま室温にて1時間静置した後に、PBSにてプレート各穴を3回洗浄し、パーオキシダーゼ標識したSHE13-6を適度にBSA/PBSにて希釈しプレートの各穴に100 $\mu\text{l}$ ずつ添加する。更に室温にてそのまま1時間静置した後に、PBSにてプレート各穴を3回洗浄する。プレートの各穴より溶液をよく取除き、オルトフェニレンジアミン2塩酸塩(シグマ社)1錠を基質溶解液(0.01%の過酸化水素を含むクエン酸緩衝液、pH5.0)10mlに溶解して(終濃度1mg/ml)、該基質溶液をプレートの各穴に100 $\mu\text{l}$ ずつ添加し、そのまま15分間静置する。次に1N硫酸溶液をプレートの各穴に100 $\mu\text{l}$ ずつ添加し酵素による発色反応を停止し、速やかに96穴プレートの各穴の発色をプレートリーダー(フロウ社製)にて波長492nmの吸光計測により定量する。標準Eカドヘリン0~800ng/mlの標準品溶液の吸光度と表示濃度とにより検量線を作製し、各測定試料液の吸光度より検量線を用いて、体液可溶性Eカドヘリン濃度を算定する。代表的な検量線を図1に示した。すなわち、約0~800ng/mlという低濃度域で測定可能であった。なお、SHE78-7とSHE3-10をそれぞれ固相化

抗体、酵素標識抗体とした場合でも、上記と全く同様にサンドイッチEIAを構築することが可能であった。

#### 【0024】(5) 体液試料の測定

悪性腫瘍患者血清51例、健常成人血清18例、悪性腫瘍患者尿21例、健常成人尿20例を対象としてHCD-1とSHE13-6の組合せによる実施例1-(4)に記載の方法により体液可溶性Eカドヘリン濃度を測定した。このうち尿は随時尿のため尿中クレアチニンをクレアチニン・テスト・ワコー(和光純薬社製)キットにより同時に測定し、尿中の体液可溶性Eカドヘリン量を尿g・クレアチニン当りの体液可溶性Eカドヘリン値(mg/g・クレアチニン)として算出した。また、試料は血清、尿いずれもBSA/PBSにて100倍に希釈し測定した。各血清中の体液可溶性Eカドヘリン濃度の分布を図2に、各尿中の体液可溶性Eカドヘリン値の分布を図3に示す。図2に示すように血清中の体液可溶性Eカドヘリン濃度の正常値上限を3μg/mlと設定した場合の悪性腫瘍陽性率は51%(26例陽性/全51例中)、健常成人は全例陰性であった(0例陽性/全18例中)。また、図3に示すように尿中の体液可溶性Eカドヘリン値の正常値上限を11.7mg/g・クレアチニンと認定した場合の悪性腫瘍陽性率は57%(12例陽性/全21例中)、健常成人は全例陰性であった\*

表 1

<内 容 物>	<容 量>	<本 数>
固相抗体液	220μl	× 1 バイアル
コーティングバッファー	11ml	× 2 バイアル
ブロッキング液	11ml	× 2 バイアル
酵素標識抗体(凍結乾燥品)	11ml用	× 1 バイアル
標準品(凍結乾燥品)	1ml用	× 1 バイアル
検体希釈液	11ml	× 2 バイアル
オルトフェニレンジアミン錠		2 錠
基質溶解液	11ml	× 2 バイアル
96穴マイクロプレート		1 枚

#### 【0027】

【発明の効果】以上詳細に説明したように、本発明により、迅速で簡便な体液中の体液可溶性Eカドヘリン測定方法が確立され、新規な悪性腫瘍の検出方法及びキットが提供された。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1-(4)におけるサンドイッチEIA系で使用する検量線を示すグラフである。

【図2】本発明の方法で測定した血清中の体液可溶性Eカドヘリン濃度の測定結果を示す図である。

【図3】本発明の方法で測定した尿中の体液可溶性Eカドヘリン値の測定結果を示す図である。

\* (0例陽性/全20例中)。このように血清中、尿中の体液可溶性Eカドヘリン量を正常値と比較することにより悪性腫瘍の検出が可能であった。

#### 【0025】実施例2

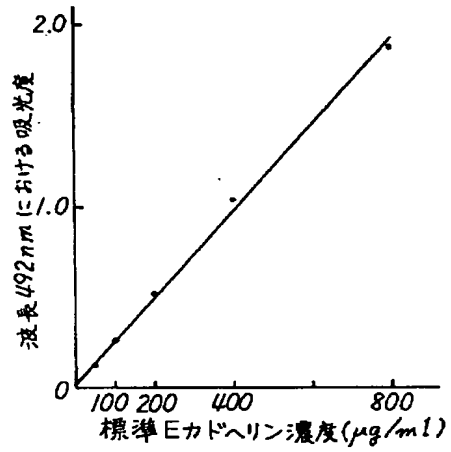
##### キットの構築

表1に示すように体液可溶性Eカドヘリン測定用EIAキットを構築した。このうち、酵素標識抗体は精製したSHE13-6をパーオキシダーゼで酵素標識し、該標識抗体を終濃度1mg/ml IgG含む溶液をBSA/PBSにて1000倍に希釈し、ガラスバイアル瓶に1本につき11ml封入し、そのまま凍結乾燥したものを調製した。検体希釈液は、0.1%アジ化ナトリウムを含むBSA/PBSを0.22μm口径のメンブランフィルターでろ過滅菌したものを調製した。標準品は実施例1-(1)にて調製した標準Eカドヘリンを0.1%アジ化ナトリウムを含むBSA/PBSにて希釈し800ng/ml終濃度となる溶液を作製し、この標準品溶液をガラスバイアル瓶1本に1ml封入し、そのまま凍結乾燥したものを調製した。その他は、実施例1-(4)に記載のものを使用した。

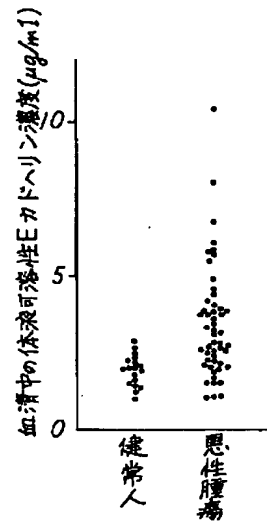
#### 【0026】

##### 【表1】

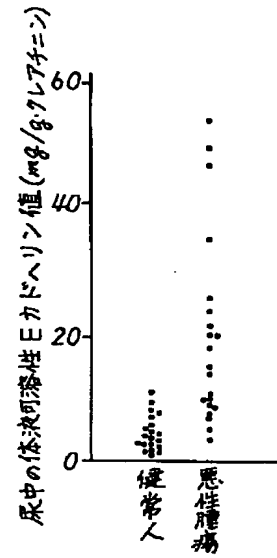
【図1】



【図2】



【図3】



JP1994324046A

1994-11-25

## Bibliographic Fields

## Document Identity

(19)【  
日本国特許庁 . . . .  
(12)【  
公開特許公報 . . .  
(11)【  
特開平 . . . . .  
(43)【  
平成 . 年 . . . . . 月 . . 日

## Public Availability

(43)【  
平成 . 年 . . . . . 月 . . 日

## Technical

(54)【  
悪性腫瘍 . 検出方法及 . キ  
(51)【 5 版 .  
G01N 33/574 Z 8310-2J  
33/53 D 8310-2J  
【  
.  
【  
. .  
【  
.

## Filing

【  
未請求  
(21)【  
特願平 . . . . .  
(22)【  
平成 . 年 . . . . . 月 . . 日

## Foreign Priority

(31)【

(19) [Publication Office]  
Japan Patent Office (JP)  
(12) [Kind of Document]  
Unexamined Patent Publication (A)  
(11) [Publication Number of Unexamined Application]  
Japan Unexamined Patent Publication Hei 6 - 324046  
(43) [Publication Date of Unexamined Application]  
1994 (1994) November 25 days

(43) [Publication Date of Unexamined Application]  
1994 (1994) November 25 days

(54) [Title of Invention]  
**DETECTION METHOD AND KIT OF MALIGNANT TUMOR**  
(51) [International Patent Classification, 5th Edition]  
G01N 33/574 Z 8 31 0-2J  
33/53 D 8 31 0-2J  
[Number of Claims]  
4  
[Form of Application]  
FD  
[Number of Pages in Document]  
7

[Request for Examination]  
Unrequested  
(21) [Application Number]  
Japan Patent Application Hei 6 - 71308  
(22) [Application Date]  
1994 (1994) March 17 days

(31) [Priority Application Number]



**JP1994324046A**

**1994-11-25**

特願平 . . . . .

Japan Patent Application Hei 5 - 82506

(32)【

(32) [Priority Date]

平 . . . . . 月 . . 日

1993 (1993) March 18 days

(33)【

(33) [Priority Country]

日本 . . . .

Japan (JP )

**Parties**

**Applicants**

(71)【

(71) [Applicant]

【

[Identification Number]

. . . . .

591,038,141

【

[Name]

寶酒造株式会社

**寶 SAKE STRUCTURE KK**

【

[Address]

京都府京都市伏見区竹中町 . . . 番地

Kyoto Prefecture Kyoto City Fushimi-ku Takenaka town 609 address

**Inventors**

(72)【

(72) [Inventor]

【

[Name]

片山 政彦

Katayama Masahiko

【

[Address]

滋賀県大津市瀬田 . 丁目 . 番 . 号 寶酒造株式会社中央研究所内

Shiga Prefecture Otsu City Seta 3 -Chome 4-1 inside of 寶 sake structure KK Central Research Laboratory

(72)【

(72) [Inventor]

【

[Name]

平井 小百合

Hirai small Lilium brownii var. colchesteri

【

[Address]

滋賀県大津市瀬田 . 丁目 . 番 . 号 寶酒造株式会社中央研究所内

Shiga Prefecture Otsu City Seta 3 -Chome 4-1 inside of 寶 sake structure KK Central Research Laboratory

(72)【

(72) [Inventor]

【

[Name]

加藤 郁之進

Shin Kato Kaoru Itaru

【

[Address]

滋賀県大津市瀬田 . 丁目 . 番 . 号 寶酒造株式会社中央研究所内

Shiga Prefecture Otsu City Seta 3 -Chome 4-1 inside of 寶 sake structure KK Central Research Laboratory

**Agents**

(74)【

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

JP1994324046A

1994-11-25

【

[Patent Attorney]

【

[Name]

中本 宏 ・ 外 ・ 名 ・

Nakamoto Hiroshi (2 others )

**Abstract**

(57)【

(57) [Abstract]

【

[Objective]

体液可溶性 E ・ ・ ・ ・ ・ 量 ・ 測定す ・ ・ ・ ・ ・  
・ ・ ・ ・ ・ 悪性腫瘍 ・ 検出す ・ 方法 ・ 及 ・ キ

Method of detecting malignant tumor by measuring body fluid solubility Ecadherin quantity. And kit is offered.

【

[Constitution]

体液中 ・ 体液可溶性 E ・ ・ ・ ・ ・ 量 ・ 測定 ・ ・  
そ  
法 ・

detection method ・ of malignant tumor which measures body fluid solubility Ecadherin quantity in body fluid, compares value with healthy value

体液可溶性 E ・ ・ ・ ・ ・ 反応性 ・ 有す ・ 抗体  
・ 含有す ・ ・ 上記検出方法 ・ 実施す ・ た め  
性腫瘍検出用キ

malignant tumor assay kit ・ in order contains antibody which possesses reactivity in the body fluid solubility Ecadherin, to execute above-mentioned detection method

体液 ・ 例 ・ ・ 血清 ・ 血漿 ・ 及 ・ 尿 ・ ・ ・ ・ ・

There is a blood serum ・ blood plasma ・ and a urine as example of body fluid.

【

[Effect(s)]

悪性腫瘍 ・ 検出 ・ 迅速 ・ 簡便 ・ 行 ・ ・ ・ ・ ・ キ  
・ ・

It detects malignant tumor quickly and simply, it is possible .

**Claims**

【

[Claim(s)]

【 1 ・

[Claim 1]

体液中 ・ 体液可溶性 E ・ ・ ・ ・ ・ 量 ・ 測定 ・ ・  
そ  
性腫瘍 ・ 検出方法 ・

body fluid solubility Ecadherin quantity in body fluid is measured, value is compared with healthy value detection method ・ of malignant tumor which is made feature

【 2 ・

[Claim 2]

体液可溶性 E ・ ・ ・ ・ ・ 反応性 ・ 有す ・ 抗体  
・ 用 ・ ・ 体液可溶性 E ・ ・ ・ ・ ・ 量 ・ 測定す ・  
請求項 1 記載 ・ 方法 ・

method ・ which is stated in Claim 1 which measures body fluid solubility Ecadherin quantity making use of antibody which possesses reactivity in the body fluid solubility Ecadherin

【 3 ・

[Claim 3]

体液 ・ ・ ・ 血清 ・ 血漿 ・ 又 ・ 尿 ・ 用 ・ ・ 請求項  
1 又 ・ 2 記載 ・ 方法 ・

method ・ which is stated in Claim 1 or 2 which uses blood serum ・ blood plasma ・ or the urine as body fluid

【 4 ・

[Claim 4]

体液中 ・ 体液可溶性 E ・ ・ ・ ・ ・ 量 ・ 測定 ・ ・  
そ  
瘍 ・ 検出 ・ 行 ・ た め  
溶性 E ・ ・ ・ ・ ・ 反応性 ・ 有す ・ 抗体 ・ 含有  
・ す ・ ・ ・ ・ ・ 特徴 ・ す ・ 悪性腫瘍検出用キ

body fluid solubility Ecadherin quantity in body fluid is measured, with kit in order to detect malignant tumor value is compared with healthy value with, antibody which possesses reactivity in body fluid solubility Ecadherin is contained malignant tumor assay kit ・ which is made feature

## Specification

[

[0001]

[

本発明は、悪性腫瘍の検出方法及び検出用キットに関する。

[0002]

[

分子量約0.1万前後の膜貫通性を持つ細胞膜表面分子を細胞間接着に関与するCa<sup>2+</sup>依存的機能を発揮する質。

現在、数分子種が発見され、最も古く単離・同定された分子種はE、N、Pの3種類である。

3種類の分子種は、同一分子種同志を選択的に結合する性質を示す。知、同質結合機構、族・特徴、1考。

分子種は、特異生命体の発生・分化過程、組織構築、重要な細胞間接着分子として知られ、神経組織、心臓、胎盤、生体内に特定臓器にそれぞれ一定分子種が主要に分布し、多様な組織形成、細胞接着機能に発揮する。考(M. Takeichi) (Science) 第251巻 第1451~1455頁(1991)。

代表的3種類はE、上皮細胞、上皮組織に主要に発現する分子で、免疫組織染色法に用いられ、疾患組織中に局在し、調節する。Y. Shimoyama) キ(Cancer Research) 第49巻 第2128~2133頁(1989)。

検討の結果、特異悪性腫瘍組織にEの量が減少する現象が数多く見出された。

動物実験により、悪性腫瘍細胞株にEの量が多ければ細胞間接着が強く、株比でEの量が少なければ細胞間接着が弱く、悪性度が高ければ確

[Description of the Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application]

this invention regards detection method and assay kit of malignant tumor.

[0002]

[Prior Art]

cadherin with plasma membrane surface molecule which has membrane penetration domain approximately of molecular weight approximately 100,000, is protein which shows function in Ca<sup>2+</sup> ion dependent which coexists in regard to glueing between the cell-cell.

To presently molecular type is discovered by cadherin many, 3 kinds of the Ecadherin, Ncadherin, Pcadherin are well known even among those to be oldest as molecular type which isolation and identification is done.

As for molecular type of these 3 kinds only respective same molecule kind the selectively shows property which is connected, it is known, these same material coupling mechanism are thought one of feature of cadherin family.

These cadherin molecular type are important intercellular adhesion molecule which with process of occurrence and differentiation of especially living thing works in organization construction, it is known, in specific organ of inside the body such as nerve organization and heart and placenta respective fixed molecular type distribution has made principal, is many, It is thought that cell adhesion function is shown in formation of the respective organization, {M. bamboo I jp8 (M. Takeichi), Science (Science), second Vol. 51, 14th 51~1455 page (1991)}.

Among cadherin of these representative 3 kinds, as for Ecadherin with molecule which is revealed principally in epithelial cell and epithelial tissue in human and mouse etc, localized in organization of various disease such as is inspected making use of immunohistological staining method etc, {Y. ti haze (Y. Shimoyama) and others, Cancer Research (0008 - 5472, CNREA8) (Cancer research), Vol. 49, second 128~2133 page (1989)}.

phenomena which Ecadherin amount of expression has decreased from result of those examination, in especially malignant tumor organization is many discovered.

In addition, regarding animal experiment, tendency which forms transfer lesion with probability where Ecadherin amount of expression to be less strain where intercellular adhesion is weak degree of malignancy is higher intercellular

率・転移病巣・形成す 傾向・見出・  
 U.H. (U.H.Frixen)  
 (Journal of Cell Biology)  
 第113巻・第173~185頁(1991)

結果・細胞表面・表示  
 E・量・悪性腫瘍転移性能・悪性  
 度・間・密接・関連・推測

【0003】

・た一方・本質的・膜貫通領域・分子内  
 部・有す・界面活性剤・含  
 溶媒中・可溶化す・性質・持  
 た・界面活性剤・含・溶媒中・細胞  
 抽出液・分子・胞外  
 領域・一部・極め・切断  
 ・易・切・出・た・分子量8万前後・低分子  
 ・解断片・界面活性剤・含  
 ・水系溶媒中・可溶化状態・存在・き  
 既・知・M.J.  
 (M.J. Wheelock)  
 (Journal of Cellular  
 Biochemistry)・第34巻・第187~202頁(1987)

・生  
 ・分解物・動物・生体液中・存在す  
 ・従来全知・た  
 ・た・従来・解物・主要  
 構成分子・す・可溶性・溶濃度  
 ・測定・含有量算出す・技術・存在  
 ・た・起因す

【0004】

【解決・す課題・

・た古・解析・き・た・胞上・E  
 ・発現量・悪性腫瘍・疾患・関連  
 ・従来E・検出技術・用  
 ・き・た・抗体・組織化学的検出法  
 ・法・免疫  
 沈降法・方法・定性的方法  
 ・患者・組織生検材料  
 採取・危険・伴・た・試薬・機器・準備  
 ・時間・点・実際・疾患  
 ・診断・臨床の応用・極め・難  
 ・た

本発明・目的・体液可溶性E・簡便

adhesion is strong inside Ecadherin amount of expression of malignant tumor cell line to be many in comparison with strain where, is high seesand comes out and is {U.H. jp9 habit (U.H.Frixen) and others, journal of cell biology (Journal of Cell (0092 - 8674) biology), Vol.113 17th 3~185 page (1991)}.

From these results, it is presumed in quantity of Ecadherin which is been indicator in in cell surface and transition talent of malignant tumor and between degree of malignancy that there is relation of intimate.

【0003】

Portion of extracellular domain of cadherin molecule it is easy to be cut off with the quite protease in addition on other hand, as for cadherin which essentially possesses membrane spanning region in intramolecular section with property which solubilizing is done only in in solvent which includes the boundary surfactant etc, in addition, in cell extracted liquid etc in in solvent which does not include boundary surfactant, As for low molecular weight cadherin disassembly fragment approximately of molecular weight 8 0,000 which is quarried out in aqueous solvent which does not include boundary surfactant etc it can exist it is already known with solubilizing state, {M.J. fee lock (M.J. Wheelock) and others, journal of cellular biochemistry (Journal of Cell (0092 - 8674) uar Biochemistry (0006 - 2960, BICHAW)), Vol.34 18th 7~202 page (1987)}.

But, it was not completely informed until recently that cadherin lysate which it occurs by protease exists in human and animal or other organism liquid.

In addition, this until recently measures solution medium concentration of solubility cadherin which designates cadherin lysate as principal constituent molecule, originates in also the technology which calculates content not existing.

【0004】

【Problems to be Solved by the Invention】

In addition, for a long time concerning relation between Ecadherin amount of expression and malignant tumor or other disease on cell which is analyzed with antibody which is used until recently as Ecadherin detection technology as for histochemical detection method and flow site tri- and Western blot method and immunoprecipitation or other method which with qualitative method with thing, in recovery of organization biopsy material from patient etc hazard accompanying, Those whose diagnosis or other clinical application of disease quite is difficult actually at or other point where time is required for reagent and the preparation etc of equipment.

It is to offer method and kit where objective of this invention

body fluid solubility Ecadherin simply establishes method which quantification is done,detects malignant tumor making use of said method.

[0005]

**[Means to Solve the Problems]**

If this invention is outlined, first invention of this invention regards the detection method of malignant tumor, it measures body fluid solubility Ecadherin quantity, value it is compared with healthy value makes feature.

In addition second invention of this invention regards malignant tumor assay kit, it measures body fluid solubility Ecadherin quantity in body fluid, with kit in order to detect malignant tumor value is compared with healthy value with antibody which possesses reactivity in body fluid solubility Ecadherin it is contained it makes feature.

[0006]

As for these inventors above problem of Prior Art which is expressed isconsidered, method which trace amount concentration in solution of body fluid solubility Ecadherin measures simply is established, body fluid solubility Ecadherin constant amount exists in the body fluid of human and animal with measurement method , phenomena which youdiscover , body fluid solubility Ecadherin quantity rises significantly in disease \* especially malignant tumor of host index, this invention it reached to completion.

In addition, collecting reagent in order to use for method of the this invention, to kit it converted, made simpler measurement possible.

[0007]

Regarding to this invention, body fluid solubility Ecadherin which becomes measurement subject, including all molecule which such as lysate in Ecadherin molecule or nondegradable ones of Ecadherin which with solubility exists in body fluid derive, as for those mainly configuration it is done by Ecadherin lysate approximately of molecular weight 8 0,000.

[0008]

You can list method which uses antibody which possesses reactivity in for example body fluid solubility Ecadherin as assay of body fluid solubility Ecadherin in this invention.

If enzyme immunoassay (EIA), it is a method which such as radioimmunoassay ▪ fluoro-immunoassay ▪ immunity turbidimetric method ▪ latex coagulation method body fluid solubility Ecadherin can measure as example of said method, it is good anything, but the especially EIA is desirable from fact that operation is simple.

【0009】

体液可溶性 E . . . . . 反応性 . 有す . 抗体  
 . . . . . 抗体又 . . . . .  
 . 抗体 . . . . . た 抗体由来動物 .  
 . . . . . 一般 . 実験動物 . .  
 . 用 . . . . . 動物 . . . . . 使用 . . . .  
 . . . . . 抗原 . 対す . 特異的 反応性 . 確実 . . .  
 大量製造 . 容易 . . . . . 由来 . . .  
 . . . . . 抗体 . 使用す . . . . . 特望 . . .  
 . . .

. . . . . 由来 . . . . . 抗体 . 例 . . . . .  
 HEC D-1 (宝酒造社製) \*SHE78-7 (宝酒造社製)  
 . . . . . た 贋品 . . . . . 本発明者 . 新た 作  
 製 . た SHE13-6 \*SHE3-10 . 挙 . . . . .

. . . . . 4 種 . . . . . 抗体 . E . . . . .  
 分子上 . 互 . 異 . . 部位 . 認識す . . 任  
 意 . 組合 . . EIA 系 . 構築す . . . . . き . .

例 . . . HEC D-1 . SHE3-10 . 組合 . .  
 SHE78-7 . SHE3-10 . 組合 . . EIA 系 . 構築  
 す . . . . . き . . .

. た SHE13-6 . 体液可溶性 E . . . . . 対 .  
 . 強 . 反応性 . 示 . . 細胞上 . 非断片化 E . . .  
 . . . . . 弱 . 反応性 . 示 . . . . .

. た . . . SHE13-6 . 使用す . . . . .  
 均一 . 体液試料中 . 体液可溶性 E . . . . .  
 測定す . . . . . 簡 . . . . .

. . . . . 抗体 . 当業者 . . . . . 公知 . 技術 .  
 . 適宜 . 断片化 . 標識化 . 固定化 . 修飾化 .  
 . . 処理 . 施 . . . . .

【0010】

本発明 . 使用す . 体液 . . . . . 血清 . 血漿 .  
 尿 . 髄液 . 羊水 . 腹水 . . . . . 液 . . 通常 . 体  
 外診断医療 . . . . . 採取 . . . . . 試料す . . . .  
 含 . . 組織 . 細胞 . 溶媒 . . . . . 洗浄液 .  
 抽出液 . 含 . . . . . す . . . . . 特頻繁 . 用 . . .  
 . 採取 . 簡便 . . . . . . 血清 . 尿 . 好 . . .  
 . . .

【0011】

本発明者 . . . . . 体液可溶性 E . . . . . 測定法  
 . . . . . EIA . . . . . 体液可溶性 E  
 . . . . . 反応性 . 有す 2 種 . 異 . . . . .  
 . . . . . 抗体 . 一方 . . . . .

[0009]

It is good with whichever of polyclonal antibody or monoclonal antibody as antibody which possesses reactivity in body fluid solubility Ecadherin, in addition antibody derivative animal mouse \* rat \* rabbit etc generally it is possible to use insidewhichever of animal which is used as experimental animal, but specific reactivity for antigen being secure, uses mouse derivative monoclonal antibody from fact that large scale production is easy especially is desirable.

HEC D-1 (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063 ) supplied ), SHE78-7 (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063 ) supplied ) with other than commercial product which was said, you can list SHE1 3- 6 \*SHE3- 10 which these inventors produces anew as example of the mouse derivative monoclonal antibody.

Because monoclonal antibody of these 4 kinds recognizes site where top of Ecadherin molecule differs mutually, EIA system can be constructed with combination of option.

EIA system can be constructed with combination of combination, the SHE78-7 and SHE3- 10 of for example HEC D-1 and SHE3- 10.

In addition, SHE1 3- 6 it shows strong reactivity vis-a-vis body fluid solubility Ecadherin, only weak reactivity shows in non- fragmentation Ecadherin on cell.

Therefore, it depends on using SHE1 3- 6, from body fluid solubility Ecadherin in body fluid specimen is measured is possible in uniform.

As for these antibody fragmentation \* labelling \* fixation and decoration conversion or other treatment may be administered appropriately by known technology in person skilled in the art.

[0010]

As body fluid which is used for this invention, including specimen everything which can recover in conventional outside the body diagnosis medical care such as blood serum \* blood plasma \* urine \* spinal fluid \* sheep water and spleen \* phosphorus pas liquid , also washing liquid and extracted liquid include with such as organization and solvent of cell it does, but it is used by especially frequent and blood serum and urine are desirable from fact that recovery issimple.

[0011]

As for these inventors, sandwich type EIA, it succeeded in to adsorb into microplate or other solid phase, labelling doing other with peroxidase enzyme, establishing one side of monoclonal antibody where 2 kinds which possess reactivity

固相・吸着・他方・・・キ・・・酵素・  
標識・・・両者・組合・・・初め 確  
立す・・・成・た

・・・体液可溶性 E・・・測定IA 法・・・数  
ng/ml・・・低・濃度・溶液中・体液可溶性 E  
・・・・・・定量・能・・・従来・・・種・  
体液可溶性 E・・・測定法・載・・・

・た ・本発明者・・・体液可溶性 E・・・  
測定 EIA ・用・・・健康・成人・血清・血  
漿・及・尿中・数ng/ml・・・数  $\mu$ g/ml ・範囲・  
体液可溶性 E・・・検出・・・見  
出・た

従来・・・又・動物由来・・・種・体液中・体  
液可溶性 E・・・存在す・・・事実・  
見出・・・た

【0012】

更・・・本発明者・・・発明・発展・・・  
数十名・疾患患者・体液中・体液可溶性 E・  
・・・量・筋・数十名・健康人体液中・  
体液可溶性 E・・・量・筋・比較・統  
計的・解析・・・悪性腫瘍患者・・・有意・そ  
・値・上昇す・現象・見出・・・腫瘍・・・  
・病気・診断・病状・把握・・・極め  
用・・・見出・た

そ 試料・・・用・・・キ  
・・・示す 共・更・採取・簡便・尿・体  
液試料・・・用・・・可能・・・示  
た

・・・様・体液可溶性 E・・・簡便・体液  
中・存在す・腫瘍・・・用・た 例  
過去・・・

【0013】

・た ・本発明・方法・用・固相化抗体液・標  
識抗体液・標準品溶液・基質溶液・・・試薬  
類・・・め  
便・体液可溶性 E・・・測定・行・・・  
キ

・・・キ 試薬・溶液状・・・凍  
結乾燥品・・・

【0014】

以上詳細・説明・た・・・本発明・・・従来  
不可能・・・た 体液中・体液可溶性・・・  
・微量測定・可能・・・血清尿・・・た  
一般臨床検査・用・・・体液・使用・・・従

in body fluid solubility Ecadherin differ for first time by union  
doing both as body fluid solubility Ecadherin measurement  
method.

As for this body fluid solubility Ecadherin measurement EIA  
method, you call several ng/ml, quantification of body fluid  
solubility Ecadherin in solution of low concentration being  
possible, body fluid solubility Ecadherin measurement method  
of this kind is not reported until recently.

In addition, as for these inventors in blood serum・blood  
plasma・of healthy human adult and in the urine from  
several ng/ml body fluid solubility Ecadherin can be detected  
in range of the several  $\mu$ g/ml making use of this body fluid  
solubility Ecadherin measurement EIA, you discovered.

Until recently, fact that was not discovered body fluid  
solubility Ecadherin exists in body fluid of this kind of human  
or animal derived.

[0012]

Furthermore, these inventors these inventions developing,  
compares distribution of body fluid solubility Ecadherin  
quantity in body fluid of disease patient of several tens name,  
and the distribution of body fluid solubility Ecadherin  
quantity in healthy person body fluid of several tens name  
analyzes statistically, phenomena where value rises  
significantly in the malignant tumor patient index, Quite it is  
useful in diagnosis of disease and grasp etc of the disease  
condition as tumor marker, you discovered.

As and, blood serum you can use it shows, as body fluid  
specimen furthermore also it is possible to use urine whose  
recovery is simple as body fluid specimen it showed.

This way as for reported example which uses body fluid  
solubility Ecadherin as tumor marker which exists in simple  
body fluid there is not a past.

[0013]

In addition, solidification antibody liquid and labelled  
antibody liquid which are used for method of this invention,  
collecting standard article solution・substrate solution or  
other reagent, compared to it measures simply body fluid  
solubility Ecadherin by making kit, it is possible.

Furthermore, reagent which is included to kit is good  
even with solution state and it is good even with lyophilized  
product.

[0014]

As above explained in detail, until recently trace amount  
measurement of the body fluid solubility Ecadherin in body  
fluid which is impossible became possible depending upon  
the this invention, using body fluid which is used for general

来存在 ・ ・ ・ ・ ・ 新規 ・ 腫瘍 ・ ・ ・ ・ ・ 疾患 ・  
 ・ ・ ・ ・ ・ 可能 ・ ・ ・ ・ ・ た ・

【0015 ・

【

本発明 ・ 実施例 ・ ・ ・ ・ ・ 更 ・ 詳細 ・ 説明す ・  
 ・ ・ 本発明 ・ ・ ・ ・ ・ 実施例 ・ 限定 ・ ・ ・ ・ ・  
 ・ ・ ・ ・ ・

【0016 ・

実施例 1

(1)免疫原 ・ 調製

健康妊婦 ・ ・ ・ ・ ・ 分 ・ ・ ・ ・ ・ 時 ・ 採取 ・ ・ ・ ・ ・ た胎盤 ・ ・ ・  
 20mM ・ ・ ・ ・ ・ 生理緩衝食塩水(150mM NaCl ・  
 5mM CaCl<sub>2</sub> ・ 2mM NEM ・ 0.3mM PMSF ・ 0.2%  
 NaN<sub>3</sub> ・ 含 ・ ・ pH7.6)(以下 TBS ・ 略す) ・ ・ ・ 5  
 回洗浄 ・ 付着 ・ ・ ・ ・ ・ 血液 除去 ・ た ・

洗浄 ・ た胎盤 500g ・ TBS1 ・ ・ ・ ・ ・ 共 ・ ・ ・ ・ ・  
 ・ ・ ・ ・ ・ 中 ・ ・ ・ ・ ・ 細片化 ・ た ・

充分 ・ 細片化 ・ た後 ・ 高速遠心分離 ・ ・ ・ 抽  
 出液上清 ・ 不溶物 ・ ・ 分離 ・ た(2000g × 30 分  
 間) ・

次 ・ ・ ・ ・ ・ 抗 ・ E ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・  
 抗体 HEC D-1(宝酒造社製)10mg ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・  
 活性化 ・ 社製)2g ・ 吸  
 着 ・ ・ ・ ・ ・ HEC D-1 抗体固定化 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 調  
 製 ・ た ・

調製 ・ た HEC D-1 抗体 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 充  
 ・ ・ ・ ・ ・ TBS ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 洗浄 ・ た ・

引続き 先 調製 ・ た胎盤抽出上清液 ・ 本 ・ ・ ・ ・ ・  
 ・ 流 ・ ・ ・ ・ ・ 後 TBS1 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 十分 ・ ・ ・ ・ ・  
 ・ 洗浄 ・ た ・

・ ・ ・ ・ ・ 洗浄 ・ た後 ・ ・ 8M 尿素 ・ 含有す TBS  
 ・ ・ ・ ・ ・ 抗体 ・ ・ ・ ・ ・ 吸着 ・ た 攪物質 ・ 溶出 ・  
 た ・

溶出 ・ ・ ・ ・ ・ た ・ ・ ・ ・ ・ ・ 質溶液 ・ 透析 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 入  
 ・ ・ ・ ・ ・ 1 晩 4 deg C 条件下 ・ ・ ・ ・ ・ TBS5 ・ ・ ・ ・ ・ 中  
 ・ 透析 ・ た ・

透析 ・ ・ ・ ・ ・ 完全 ・ 尿素 ・ 除去 ・ た後 ・ ・ ・ ・ ・ 溶  
 出 ・ ・ ・ ・ ・ 溶液 ・ 再 ・ 前記 ・ HEC D-1 抗体固  
 定化 ・ ・ ・ ・ ・ 流 ・ ・ ・ ・ ・ 前記 同様 ・ 操作 ・ ・ ・ ・ ・ 抗  
 体 ・ ・ ・ ・ ・ 抗原物質 ・ 溶出 ・ た ・

溶出液 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 社製) ・  
 ・ ・ ・ ・ ・ ・ 質濃度 1mg/ml 程度 ・ 濃縮 ・ 2mM

laboratory test such as the blood serum and urine monitor of  
 disease became possible with the novel tumor marker which  
 does not exist until recently.

[0015]

[Working Example(s)]

this invention furthermore is explained in detail with Working  
 Example, but the this invention is not something which is  
 limited in these Working Example.

[0016]

Working Example 1

Manufacturing (1) immunogen

From healthy pregnant woman when giving birth placenta  
 whichrecovers, 5 times was washed with 20 mM tris menses  
 buff saline (150 mM NaCl ・ 5 mM Ca Cl<sub>2</sub> ・ 2 mM NEM ・ 0.3  
 mM PMSF ・ 0.2% NaN<sub>3</sub> are included, pH 7.6 ) (Below TBS  
 you abbreviate. ) and the blood which has deposited was  
 removed.

placenta 500g which you washed with TBS1 liter flaking was  
 done in the homogenizer.

flaking after doing, extracted liquid supernatant and insoluble  
 matter were separated into the satisfactory due to high speed  
 centrifugal separation (2000 gX 3 0 min ).

Next, anti-human Ecadherin mouse monoclonal antibody  
 HEC D-1 (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063 )  
 supplied ) 10 mg cyanogen bromide activated Sepharose  
 (Pharmacia make) adsorbinginto 2 g, it manufactured HEC  
 D-1 antibody fixation Sepharose.

Filling up HEC D-1 antibody gel which it manufactures in  
 glass column, TBS being you washed column well.

Continuously, placenta extraction supernatant liquid which is  
 manufactured firstwas let flow to this column, after that with  
 TBS1 liter column waswashed in fully.

After washing column, antigen substance which adsorbs into  
 antibody column with TBS which contains 8 Murea was  
 liquated.

Inserting protein solution which is liquated in dialysis tube,  
 under overnight 4 deg Ccondition dialysis it did in TBS5 liter.

After removing urea completely with dialysis , this liquation  
 protein solution was let flow to aforementioned HEC D-1  
 antibody fixation column again,antigen substance was  
 liquated from antibody column with operation of beingsimilar  
 to description above.

It concentrated eluate in protein concentration 1 mg/ml extent  
 with collodion pack (Sartorius supplied ), dialysis itdid under



CaCl<sub>2</sub> 含・生理食塩水 5 対・1 晩  
4 deg C 条件下・透析処理した

得・た・質溶液・抗・E  
抗体・HECD-1・強・  
反応す・抗原物質・主要・含・該抗原  
物質・主・E・鯨物・構  
成・(以後・質抗原・標準 E  
称す)

標準 E 500 μg  
分注・80 deg C 以下・条件・免疫原・  
標準物質・使用す・時・凍結保存  
た

【0017】

(2) 抗体・作製

実施例 1-(1) 取得・た標準 E 500  
μg  
社製・等量混合・6 週令 Balb/c 5  
匹(日本・社製)・腹腔内・等分・投与  
た

4 週間後・標準 E 500 μg  
TDM(社製)・等量混合・既免疫  
5 匹・再・等分・腹腔内投与・た

更・4 週間後後者・投与操作・再度同・5  
匹・実施・た

そ 3 日後・そ 2 匹・脾  
臓・摘出・方法・  
従・細胞融合・行・細胞・  
作製・た

標準 E 鼠・使用・ELISA 法  
標準 E 反応性・有す・  
抗体・産生す・選択  
た

す・標準 E TBS 中・希釈・  
終濃度 10 μg/ml 溶液 調製 96 穴・  
(社) 適量分注・そ  
4 deg C 24 時間静置・た  
中・溶液・す・廃棄・1% 血清・  
含・酸緩衝生理食塩水(以下 BSA/PBS  
称す) 満た 37 deg C 条件下  
1 時間静置・た

そ 後・中・溶液・す・廃棄・  
酸緩衝生理食塩水(以下 PBS 称す) 2 回  
洗浄・上記 作製・たす  
細胞・培養上清・そ  
各穴・添加・た

overnight 4 deg C condition vis-a-vis physiological saline 5  
liter which includes 2 mM Ca Cl<sub>2</sub>.

protein solution which it acquires includes antigen substance  
which reacts to the HEC D-1 which is a anti-human Ecadherin  
mouse monoclonal antibody strongly in principal, said antigen  
substance configuration is done by human Ecadherin lysate  
mainly, (From now on, this protein antigen, is named standard  
Ecadherin. ).

In 500;μg at a time aliquot it did this standard Ecadherin in  
tube, when - using with condition of 80 deg C or less to as  
immunogen or the standard substance, freezing it retained.

【0017】

Production of (2) monoclonal antibody

Freund \* Kong pre \* jp7 \* adjuvant (Difco make) with  
equivalent it mixed standard Ecadherin 500;μg which  
is acquired with Working Example 1- (1), 6-week-old  
Balb/c mouse 5 animals equal parts did in intraperitoneal of  
the (Clea Japan Inc. (DB 69-073-1062) supplied) and  
prescribed.

jp9 via bunt TDM (jp9 supplied) with equivalent it  
mixed standard Ecadherin 500;μg 4 weeks, later equal parts  
made again previous immune mouse 5 animals and the  
intraperitoneal administration did.

Furthermore dosage operation of the latter of 4 weeks later  
was executed for second time in same mouse 5 animals.

After 3 days, avulsion it did spleen from mouse of 2 animals  
among those, followed to method of Kellar and Milstein and  
and others did cell fusion, produced hybridoma cell.

You used standard Ecadherin as antigen, you selected  
hybridoma which produces monoclonal antibody which  
possesses reactivity in standard Ecadherin with ELISA  
method.

Diluting namely, standard Ecadherin in TBS, it manufactured  
solution which becomes final concentration 10 μg/ml, 96  
-hole microplate suitable amount aliquot did in (jp10  
corporation), after 24 hours standing doing that way with 4  
deg C, it abolished solution in the plate entirely, it filled up  
phosphate buffered saline (It names below BSA/PBS.) which  
includes 1% bovine blood serum albumin in plate, 1 hour  
standing did under 37 deg C condition.

After that, as though solution in plate is entirely abolished and  
twice plate is washed with phosphate buffered saline (It  
names below PBS.), it is a description above, the culture  
supernatant of all hybridoma cell which are produced was  
added to each hole of the respective plate.

そ ・ ・ ・ 室温 ・ ・ ・ 1 時間 ・ ・ ・ ・ 静置 ・ た 後  
 ・ PBS ・ ・ ・ 3 回 洗 浄 ・ た ・

次 ・ ・ ・ 抗 ・ ・ ・ IgG ・ ・ ・ キ ・ ・ ・ ・ 標 識 抗  
 体 液 ( ・ ・ ・ ・ 社 製 ) ・ BSA/PBS ・ ・ ・ 適 当 ・ 希  
 釈 ・ た 溶 液 ・ ・ ・ ・ 各 穴 ・ 適 量 ・ ・ 添 加 ・  
 た ・

再 ・ そ ・ ・ ・ 室温 ・ ・ ・ 1 時間 ・ ・ ・ ・ 静 置 ・  
 た 後 ・ PBS ・ ・ ・ 3 回 ・ ・ ・ ・ 洗 浄 ・ 残 液 ・  
 十 分 ・ 取 除 ・ た ・

ABTS 基 質 液 ( ・ ・ ・ ・ 社 製 ) ・ 使 用 説 明 書 ・  
 従 ・ ・ ・ 調 製 ・ 洗 浄 終 了 後 ・ ・ ・ ・ ・ 各 穴 ・  
 適 量 ・ ・ 添 加 ・ 室 温 ・ ・ ・ 15 分 間 静 置 ・ た ・

そ 後 ・ ・ ・ 96 穴 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・  
 ・ ・ ・ ( ・ ・ ・ 社 製 ) ・ ・ ・ ・ 各 穴 ・ 発 色 ・ 波 長  
 410nm ・ 吸 光 度 ・ ・ 算 出 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・  
 ・ 比 較 ・ ・ 強 ・ 発 色 ・ 得 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・  
 ・ ・ 細胞 株 ・ 選 択 ・ た ・

・ ・ 様 ・ ・ ・ 標 準 E ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 弱  
 ・ 抗 原 抗 体 反 応 ・ 起 ・ す 抗 体 ・ 産 生 ・ 株 数  
 細胞 ・ ・ ・ 19 株 ・ 選 別 ・ た ・

・ ・ ・ 19 株 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 細胞 ・ 対 ・ ・ 2 回  
 ・ 限 界 希 釈 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 実 施 ・ 再 ・ 上 記  
 ELISA 法 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 行 ・ 最 ・ 適  
 切 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 細胞 ・ ・ ・ ・ 株 2 株 ・ 最 終  
 選 択 ・ ・ ・ ・ ・ 細胞 ・ 産 生 する ・ ・ ・ ・ ・  
 ・ 抗 体 ・ そ ・ ・ ・ SHE13-6 ・ SHE3-10 ・ 命 名 ・  
 た ・

SHE13-6 ・ SHE3-10 ・ ・ HECD-1 ・ SHE78-7 ・ 同  
 様 ・ E ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 産 生 ・ ・ ・ 既 知 ・ ・ ・  
 ・ ・ ・ ・ 皮 膚 ・ ・ 細胞 A431 表 面 ・ 強 反 応 する ・  
 ・ ・ 間 接 酵 素 抗 体 染 色 法 ・ ・ ・ 確 認 ・ た ・

・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ A431 細胞 表 面 ・ 生 理 食 塩 水 等 ・  
 十 分 ・ 洗 浄 ・ 残 留 ・ ・ ・ ・ ・ 可 溶 性 ・ ・ ・ ・ ・  
 ・ 細胞 表 層 ・ ・ 除 去 ・ た 後 ・ ・ ・ ・ 抗 体 ・ 細胞  
 表 面 E ・ ・ ・ ・ ・ 反 応 ・ 間 接 酵 素 抗 体 染  
 色 法 ・ ・ ・ 調 査 ・ た ・ ・ ・ ・ SHE13-6 ・ A431 細胞  
 表 面 ・ ・ 弱 反 応 ・ ・ 示 ・ ・ ・ ・ ・ 確 め ・  
 ・ た ・

[0018]

そ SHE13-6 ・ SHE3-10 ・ HECD-1 ・  
 SHE78-7 ・ 同 様 ・ E ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 産 生 ・ N ・  
 ・ ・ ・ ・ 産 生 ・ ・ ・ 知 ・ ・ ・ ・ HeLa 細胞  
 表 面 ・ 全 反 応 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 同 様 ・ 間  
 接 酵 素 抗 体 染 色 法 ・ ・ ・ 確 認 ・ た ・

更 ・ ・ SHE13-6 ・ SHE3-10 ・ 標 準 E ・ ・ ・ ・ ・  
 適 当 量 SDS ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ 電 気 泳 動 法

After standing doing 1 hour plate that way with room temperature, thrice you washed with PBS.

solution which dilutes anti-mouse IgG peroxidase labelled antibody liquid (Cappel supplied) next suitably with the BSA/PBS at a time suitable amount was added to each hole of plate.

Again, after standing doing 1 hour plate that way with room temperature, the thrice plate was washed with PBS, residual liquid was removed to fully.

Following ABTS substrate liquid (Amersham supplied) to use description, it manufactured, at a time suitable amount added to each hole of plate after washing ending, 15 min standing did with room temperature.

After that, you applied you calculated as absorbance of wavelength 410 nm, you selected these 96-hole microplate on plate reader (furo supplied), coloration of each hole hybridoma cell line where strong coloration is acquired by comparison with the background.

19 strain were sorted to this way, with standard Ecadherin as antigen as the strain cell which produces antibody which causes strong antibody-antigen reaction.

It executed limiting dilution cloning of twice vis-a-vis hybridoma cell of these 19 strain, did screening again with above-mentioned ELISA method, final selected most appropriate hybridoma cell clone strain 2 strain, monoclonal antibody which these cell produce SHE1 3- 6 ・ SHE3- 10 it designated respectively.

In same way as HEC D-1 ・ SHE78-7 Ecadherin is produced strongly reacts to human skin cancer cell A4 31 surface which is already informed verified SHE1 3- 6 ・ SHE3- 10, by indirect enzyme antibody dye method.

But, you wash A4 31 cell surface in fully, with such as physiological saline after removing solubility Ecadherin which has remained from cell surface layer when reaction to cell surface Ecadherin of these antibody was investigated with indirect enzyme antibody dye method, only weak reaction you show SHE1 3- 6 in A4 31 cell surface, it was verified.

[0018]

And, SHE1 3- 6 ・ SHE3- 10 did not produce Ecadherin in same way as HEC D-1 ・ SHE78-7 and Ncadherin is produced completely does not react to HeLa cell surface which is informed verified by after all similar indirect enzyme antibody dye method.

Furthermore, SHE1 3- 6 ・ SHE3- 10 separated reacts to protein of molecular weight approximately 80,000 verified

・ ・ ・ 分離 ・ ・ ・ ・ ・ 膜 電氣的 ・ 転  
写 ・ た物 ・ 用 ・ た ・ ・ ・ ・ ・ 法 ・ ・ ・ ・  
HECD-1 \*SHE78-7 ・ 同様 ・ 分子量約 8 万 ・ ・  
・ ・ ・ 質 ・ 反応す ・ ・ ・ 確認 ・ た ・

【0019 ・

・ た ・ ・ ・ ・ 族 ・ 共通す ・ 性質 ・ ・ ・ ・ ・  
・ ・ ・ 発現 ・ ・ ・ ・ 培養細胞 ・ ・ ・ ・ ・  
・ ・ ・ ・ ・ 質分解酵素 ・ ・ ・ ・ 分散 ・ ・ ・ 際  
・ 2~10mM ・ ・ ・ ・ ・ 共存下 ・ ・ ・ ・  
・ ・ ・ 分解 ・ ・ ・ ・ ・ 分子 ・ 形 ・ 保  
・ 残存す ・ ・ 2~10mM EDTA 共存下 ・ ・ ・  
・ ・ ・ ・ ・ 不在条件下 ・ ・ ・ ・ ・ 分  
解 ・ ・ ・ ・ 分子 ・ 消失す ・ ・ ・ 現象 ・ 確  
認 ・ ・ ・ ・ M. ・ ・ ・ (M.Takeichi) ・ ・ ・  
・ ・ ・ ・ ・ (Developmental  
Biology) ・ 第87 巻 ・ 第340~350 頁(1981) ・ ・

SHE13-6 ・ ・ 10mM CaCl<sub>2</sub> ・ 含 ・ 0.02% ・ ・ ・  
・ 溶液( ・ ・ 社製)処理 A431 細胞抽出液中 ・  
分子量約 10 万 ・ E ・ ・ ・ ・ 弱 ・ 反応性 ・  
示 ・ 10mM EDTA ・ 含 ・ 0.02% ・ ・ ・ 溶液  
( ・ ・ 社製)処理 A431 細胞抽出液中 ・ ・ ・  
・ 物 ・ 反応 ・ ・ ・ ・ SDS ・ ・ ・ ・ ・  
・ ・ ・ 電気泳動法及 ・ ・ ・ ・ ・ 法 ・ ・  
・ 確認 ・ た ・

【0020 ・

SHE3-10 ・ ・ HECD-1 \*SHE78-7 ・ 同様 ・  
10mM CaCl<sub>2</sub> ・ 含 ・ 0.02% ・ ・ ・ 溶液処理  
A431 細胞抽出液中 ・ 分子量約 10 万 ・ E ・ ・  
・ ・ ・ 強 ・ 反応性 ・ 示 ・ 10mM EDTA ・ 含  
・ 0.02% ・ ・ ・ 溶液処理 A431 細胞抽出液  
中 ・ ・ ・ ・ 物 ・ 反応 ・ ・ ・ ・ SDS ・ ・  
・ ・ ・ ・ ・ 電気泳動法及 ・ ・ ・ ・ ・  
・ ・ ・ 法 ・ ・ 確認 ・ た ・

・ た SHE3-10 ・ 分子量約 8 万 ・ ・ 胎盤由来  
可溶性 E ・ ・ ・ ・ 対 ・ ・ SHE13-6 ・ 同等 ・  
反応性 ・ 有す ・ ・ ・ ELISA 法 ・ ・ 確認 ・  
た ・

更 ・ SHE3-10 ・ そ 表面 ・ 十分 ・ 洗淨 ・ た  
A431 細胞表面 ・ 強 ・ 反応性 ・ 示 ・ SHE13-6  
・ 弱 ・ 反応性 ・ 示す ・ ・ ・ ・ ・  
・ ・ 法 ・ ・ 確認 ・ た ・

【0021 ・

・ ・ ・ 結果 ・ ・ ・ SHE13-6 \*SHE3-10 ・ ・  
HECD-1 \*SHE78-7 ・ 同様 ・ 標準 E ・ ・ ・ ・  
反応性 ・ 有す ・ ・ ・ ・ ・ 抗体 ・ ・  
・ ・ ・ 確認 ・ 得た ・

該 SHE13-6 産生 ・ ・ ・ ・ ・ Hybridoma  
SHE13-6 ・ 表示 ・ 命名 ・ 工業技術院生命工

standard Ecadherin due to suitable amount SD  
Spolyacrylamide-gel electrophoresis , insame way as HEC  
D-1 \*SHE78-7 by western blot method which uses those  
which arecopied to electrical in nitrocellulose film.

[0019]

In addition, occasion where cultured cell etc which reveals  
cadherin as property which is in common to cadherin family,  
is dispersed with the trypsin (EC 3.4.21.4 ) or other protease ,  
under 2 - 10 mM calcium ion coexisting cadherin is  
notdisassembled and maintains shape of that way molecule  
andremains, but Under 2 - 10 mM EDTA coexisting under or  
other calcium ion absent condition cadherin is disassembled  
and phenomena that is verified, molecule disappears, {M.  
bamboo I jp8 (M.Takeichi ) and others, ・ ・ ・ rope mentha  
jp11 \* biology (development al biology ) , 8 th 7 volumes,third  
40~350 page (1981)}.

SHE1 3- 6, it showed reactivity which is weak in Ecadherin of  
molecular weight approximately 100,000 in 0.02% trypsin  
(EC 3.4.21.4 ) solution (furo ・ supplied ) process A 4 31  
cell extracted liquid which includes 10 mM Ca Cl<sub>2</sub> it does not  
react , by SD Spolyacrylamide-gel electrophoresis or western  
blot method itverified even in what ones in 0.02% trypsin (EC  
3.4.21.4 ) solution (furo ・ supplied ) process A 4 31 cell  
extracted liquid whichincludes 10 mM EDTA.

[0020]

SHE3- 10, it showed reactivity which is strong in Ecadherin  
of molecular weight approximately 100,000 in 0.02% trypsin  
(EC 3.4.21.4 ) solution treatment A4 31 cell extracted liquid  
which includes 10 mM Ca Cl<sub>2</sub> in same way as HEC D-1 ・  
SHE78-7 it does not react , by SD Spolyacrylamide-gel  
electrophoresis or western blot method it verified even in  
what ones ones in 0.02% trypsin (EC 3.4.21.4 ) solution treatment  
A4 31 cell extracted liquid which includes 10 mM EDTA.

In addition, SHE3- 10 it possesses SHE1 3- 6 and identical  
reactivity vis-a-vis human placenta derivative solubility  
Ecadherin of molecular weight approximately 80,000,  
youverified by ELISA method .

Furthermore, SHE3- 10 shows reactivity which is strong in  
A4 31 cell surface which washed surface in fully SHE1 3- 6  
shows weak reactivity you verified by ・ ・ ・ flow site ・  
tri- method.

[0021]

From these results, SHE1 3- 6 \*SHE3- 10 when it is a mouse  
monoclonal antibody which possesses the reactivity in same  
way as HEC D-1 \*SHE78-7 in standard Ecadherin, acquired  
conclusiveevidence.

said SHE1 3- 6 production hybridoma Hybridoma SHE1 3- 6  
and it indicated, designated, the deposit did in Agency of

学工業技術研究所・寄託・た(FERM P-13389)・

・た該 SHE3-10 産生・・・・・  
Hybridoma SHE3-10 ・表示・命名・工業技術  
院生命工学工業技術研究所・寄託・た(FERM  
P-14144)・

【0022】

(3) ・ ・ ・ ・ ・ 抗体・特異性・確認  
Hybridoma SHE13-6 (FERM P-13389) ・ ・ ・ ・ ・  
・ ・ (和光純薬社製) ・ ・ ・ ・ ・ め投与・た  
Balb/c ・ ・ ・ 10 週令(日本 ・ ・ ・ 社製)腹腔内・  
大量・増殖 ・ ・ ・ 投与後約 10 日経過・た時点  
・ ・ ・ ・ ・ 腹水・採集・硫酸塩析法又 ・ ・  
・ ・ 交換 ・ ・ ・ ・ ・ 一般・抗体精製  
・ ・ ・ 用 ・ ・ ・ ・ ・ 方法 ・ ・ ・ 精製・行 ・ 精製  
SHE13-6 ・ 得た ・

SHE13-6 ・ 過 ・ ・ 素酸法 ・ ・ ・ ・ ・ キ ・ ・ ・  
・ ( ・ ・ ・ ・ ・ 社製) ・ ・ 標識 ・  
た ・

標識 E ・ ・ ・ ・ ・ 吸着 ・ た 96 穴 ・ ・ ・ ・ ・  
・ ・ 固相 ・ ・ ・ SHE3-10 ・ SHE78-7 ・ 又 ・  
HECD-1 ・ 吸着抗原・反応 ・ ・ ・ ・ ・  
そ 依存的・前述・酵素標識 SHE13-6 ・  
吸着抗原 ・ ・ 結合・阻害 ・ ・ ・ ・ ・  
ELISA 法 ・ ・ 調査・た ・ ・ ・ 両者・抗体間  
・ ・ 全・そ 競合阻害性・見出 ・ ・ ・  
・ た ・

す ・ ・ ・ ・ SHE13-6 ・ ・ 他 ・ 3 種 ・ 抗体 ・ す ・  
・ ・ SHE3-10 ・ SHE78-7 ・ 及 ・ HECD-1 ・ 標準  
E ・ ・ ・ ・ ・ 癒 ・ ・ 結合・競合 ・ ・ ・ ・ た ・  
・ E ・ ・ ・ ・ ・ 分子上 SHE3-10 ・ SHE78-7 ・ 及  
・ HECD-1 ・ 認識部位 ・ ・ 異 ・ ・ 部位・認識  
す ・ ・ ・ 確認 ・ た ・

Hybridoma SHE3-10 (FERM P-14144) ・ ・ 調製  
・ た精製 SHE3-10 ・ 及 ・ 前出・SHE78-7 ・ ・ ・  
・ ・ ・ ・ ・ 同様・検討・行 ・ ・ ・ ・ ・ 自身  
・ 除 ・ 他 ・ 3 種 ・ ・ ・ ・ ・ 抗体・抗原結  
合・関 ・ ・ 競合 ・ ・ ・ ・ ・ 確認 ・ た ・

・ ・ ・ SHE13-6 ・ SHE3-10 ・ SHE78-7 ・ 及 ・  
HECD-1 ・ ・ ・ ・ ・ E ・ ・ ・ ・ ・ 分子上異 ・  
・ 部位・認識す ・ ・ ・ 確認 ・ た ・

【0023】

(4) ・ ・ ・ ・ ・ EIA 系 ・ 構築

HECD-1 ・ SHE13-6 ・ そ ・ ・ ・ 固相化抗体・酵

Industrial Science and Technology National Institute of  
Bioscience and Human-Technology (FERM P-13389) .

In addition, said SHE3- 10 production hybridoma, Hybridoma  
SHE3- 10 and it indicated, designated deposit did in Agency  
of Industrial Science and Technology National Institute of  
Bioscience and Human-Technology (FERM P-14144) .

[0022]

Verification Hybridoma SHE1 3- 6 (FERM P-13389 ) of  
specificity of (3) monoclonal antibody, with Balb/c mouse 10  
week (Clea Japan Inc. (DB 69-073-1062 ) supplied )  
intraperitoneal which prescribes pre stain (Wako Pure  
Chemical Industries Ltd. (DB 69-059-8875 ) supplied )  
beforehand multiplying in large scale, after prescribing with  
time point which approximately 10 days&apos; passage is  
done you collected spleen from mouse, such as ammonium  
sulfate salting-out is well used for antibody purification  
generally or ion exchange chromatography you refined, with  
method which acquired refining SHE1 3- 6.

SHE1 3- 6 labelling was done with peroxidase (Boehringer  
Mannheim supplied ) with periodic acid method.

Whether or not connection to adsorption antigen of  
the aforementioned enzyme labelling SHE1 3- 6 inhibition  
designates SHE3- 10 ・ SHE78-7 ・ or HEC D-1 as adsorption  
antigen in dose dependent it reacts by , labelling Ecadherin  
96-hole microplate where it adsorbs as solid phase, when you  
investigated with the ELISA method , completely that kind of  
competitive inhibition characteristic did not discover between  
antibody of both.

namely, SHE1 3- 6 did not compete to connection to standard  
Ecadherin antigen of antibody ・ namely SHE3- 10 ・  
SHE78-7 ・ or HEC D-1 of other 3 kinds, therefore the SHE3-  
10 ・ SHE78-7 ・ on Ecadherin molecule and recognition site of  
HEC D-1 site which differs is recognized verified .

It did respective similar examination Hybridoma SHE3- 10  
(FERM P-14144 ) from concerning refining SHE3- 10 ・ , and  
depicted above SHE78-7 which are manufactured in each  
case it does not compete it verified in regard to monoclonal  
antibody and antigen connection of other 3 kinds which  
exclude itself.

Depending, you recognize site where in each case top of the  
Ecadherin molecule differs you verified SHE1 3- 6 ・ SHE3-  
10 ・ SHE78-7 ・ and HEC D-1.

[0023]

Construction of (4) sandwich EIA system

sandwich EIA was constructed with HEC D-1 and SHE1 3- 6

素標識抗体 . . . . . EIA 構築 た .

. . . PBS . . . 終濃度 1mg/ml . HEC-D-1 . 含 .  
溶液 . 調製 . . . . . 化 . . . . . 終濃度 0.1%  
. . . . . 添加 . 固相抗体液 . 調製す . . .

該固相抗体液 . . . . . (0.1% .  
. . . 化 . . . . . 含 . PBS) . . . 100 倍 . 希釈 .  
た終濃度 10  $\mu$ g/ml . 抗体溶液 . 96 穴 . . .  
. . . . . ( . . . . . F-16 . . . . . 社 ) .  
各穴 . 200  $\mu$ l . . . 添加 . 密封 . . . 4 deg C .  
24 時間静置す . . .

. 次 . . . . . 溶液 . 捨 . . . . . キ . 液  
(0.1% . . . . . 化 . . . . . 含 . BSA/PBS) . . .  
. . . . . 各穴 . 200  $\mu$ l . . . 添加 . 密封 . . . 37  
deg C . 1 時間静置す . . .

. . . . . PBS . . . 2 回洗浄 . . . 測定試料又 .  
標準 E . . . . . 800 . 400 . 200 . 100 . 50 .  
0ng/ml 含有す 標準品溶液 . . . . . 各穴 .  
100  $\mu$ l . . . 添加す . . .

そ . . . 室温 . . . 1 時間静置 . た後 . PBS .  
. . . . . 各穴 . 3 回洗浄 . . . . . キ . . . . .  
標識 . た SHE13-6 . 適度 . BSA/PBS . . . 希釈  
. . . . . 各穴 . 100  $\mu$ l . . . 添加す . . .

更 . 室温 . . . . . 1 時間静置 . た後 . . .  
PBS . . . . . 各穴 . 3 回洗浄す . . .

. . . . . 各穴 . . . 溶液 . . . 取除き . . . . .  
. . . . . 2 塩酸塩錠 ( . . . . . 社 ) 1 錠 . 基質  
溶解液 (0.01% . 過酸化水素 . 含 . . . . . 酸緩  
衝液 pH5.0) 10ml . 溶解 . (終濃度 1mg/ml) .  
該基質溶液 . . . . . 各穴 . 100  $\mu$ l . . . 添  
加 . . . . . 15 分間静置す . . .

次 . 1N 硫酸溶液 . . . . . 各穴 . 100  $\mu$ l .  
. 添加 . 酵素 . . . . . 発色反応 . 停止 . . . 速 .  
. 96 穴 . . . . . 各穴 . 発色 . . . . .  
. ( . . . . . 社製 ) . . . 波長 492nm . 吸光計測 . . .  
. 定量す . . .

標準 E . . . . . 0~800ng/ml . 標準品溶液 .  
吸光度 . 表示濃度 . . . . . 検量線 . 作製 . 各  
測定試料液 . 吸光度 . . . 検量線 . 用 . . . . . 体液  
可溶性 E . . . . . 濃度 . 算定す . . .

代表的 . 検量線 . 図 1 . 示 . た .

す . . . . . 約 0~800ng/ml . . . 低濃度域 . 測定  
可能 . . . . . た .

as solidification antibody . enzyme labelled antibody  
respectively.

First solution which includes HEC D-1 of final concentration  
1 mg/ml with PBS is manufactured, sodium azide is added in  
order to become final concentration 0.1%, the solid phase  
antibody liquid is manufactured.

said solid phase antibody liquid 96-hole microplate it adds  
200;  $\mu$ l at a time antibody solution of final concentration  
10 ;  $\mu$ g/ml which with coating buffer (PBS which includes  
0.1% sodium azide ) is diluted in 100 times, to each hole of  
(module plate F-16 . jp10 . . . corporation), seals up and 24  
hours standing does with 4 deg C.

Next, you throw away solution from plate, add 200;  $\mu$ l at  
a time blocking liquid (BSA/PBS which includes 0.1% sodium  
azide ) to each hole of plate, seal up and 1 hour standing  
down with 37 deg C.

plate twice is washed with PBS, measurement sample or  
standard Ecadherin 800, 400 and 200, 100, 50 and 0 ng/ml  
standard article solution which is contained is added 100;  $\mu$ l  
at a time to each hole of plate.

That way, with room temperature 1 hour standing after doing,  
thrice you wash the plate each hole with PBS, you dilute  
SHE1 3-6 which peroxidase labelling is done moderately  
with BSA/PBS and add 100;  $\mu$ l at a time to each hole of  
plate.

Furthermore after 1 hour standing doing that way with room  
temperature , plate each hole thrice is washed with PBS.

It removes solution well than each hole of plate, ortho  
phenylenediamine dihydrochloride pill (Sigma Chemical  
Co. ) substrate dissolved liquid (citric acid buffer . pH 5.0  
which includes 0.01% hydrogen peroxide ) melts 1 pill in 10  
ml and (final concentration 1 mg/ml ), said matrix solution  
adds 100;  $\mu$ l at a time to each hole of plate, 15 min standing  
does that way.

It adds 100;  $\mu$ l at a time 1 N sulfuric acid solution to each  
hole of plate next and stops coloration reaction with enzyme ,  
96-hole colors each hole of the plate rapidly with plate reader  
(furo . supplied ) with light absorption measurement of the  
wavelength 492 nm quantification.

measuring line is produced with with absorbance and  
indicator concentration of standard article solution of standard  
Ecadherin 0~800 ng/ml, body fluid solubility Ecadherin  
concentration is computed making use of measuring line from  
absorbance of each measurement sample liquid.

representative measuring line was shown in Figure 1.

It was a measurable with low concentration region, namely,  
approximately 0 - 800 ng/ml.



終濃度 1mg/mlIgG 含・溶液・BSA/PBS ・  
1000 倍・希釈 ・ ・ ・ ・ ・ 瓶 ・ 1 本 ・  
き 11ml 封入 ・ ・ ・ ・ ・ 凍結乾燥 ・ た ・ ・ ・ ・ 調  
製 ・ た ・

検体希釈液 ・ ・ 0.1% ・ ・ 化 ・ ・ ・ ・ ・ 含 ・  
BSA/PBS ・ 0.22  $\mu$  m 口径 ・ ・ ・ ・ ・  
・ ・ ・ 過滅菌 ・ た ・ ・ ・ 調製 ・ た ・

標準品 ・ 実施例 1-(1) ・ ・ 調製 ・ た 標準 E ・ ・  
・ ・ ・ 0.1% ・ ・ 化 ・ ・ ・ ・ ・ 含 ・ BSA/PBS  
・ ・ 希釈 ・ 800ng/ml 終濃度 ・ ・ ・ 溶液 作製  
・ ・ ・ 標準品溶液 ・ ・ ・ ・ ・ 瓶 1 本 ・  
1ml 封入 ・ ・ ・ ・ ・ 凍結乾燥 ・ た ・ ・ ・ 調製 ・  
た ・

そ 他 ・ ・ 実施例 1-(4) ・ 記載 ・ ・ ・ ・ 使用 ・  
た ・

【0026 ・

【表 1 ・

BSA/PBS it diluted solution which said labelled antibody  
final concentration 1 mg/ml IgG is included in 1000 times, 11  
ml it enclosed in glass vial bottle concerning 1, it  
manufactured those which lyophilizing are done that way.

test agent diluent BSA/PBS which includes 0.1% sodium  
azide manufactured those which filtration sterilization are  
done with membrane filter of 0.22;  $\mu$  m aperture.

standard Ecadherin which is manufactured with Working  
Example 1- (1) it diluted standard article with BSA/PBS  
which includes 0.1% sodium azide and it produced solution  
which becomes 800 ng/ml final concentration, 1 ml enclosed  
this standard article solution in glass vial bottle 1,  
itmanufactured those which lyophilizing are done that way.

Other things used those which are stated in Working Example  
1- (4).

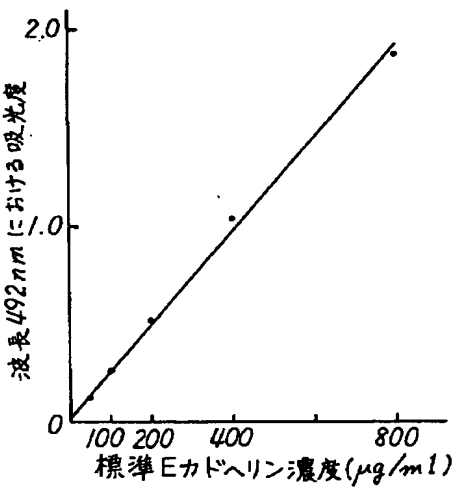
【0026】

【Table 1】

・ 内 容 物 ・	容 量 ・		・ 本	数 ・
<contents>	volume>		< Book	Number >
固相抗体液	・ $\mu$ ・	×	・	・ ・ ・ ・
solid phase antibody liquid	20; $\mu$ l	X	1	vial
・ ・ ・ ・ ・	・ ml	×	・	・ ・ ・ ・
coating buffer	11 ml	X	2	vial
・ ・ ・ キ ・ 液	・ ml	×	・	・ ・ ・ ・
blocking liquid	11 ml	X	2	vial
酵素標識抗体 凍結乾燥品 ・	・ ml 用	×	・	・ ・ ・ ・
enzyme labelled antibody (lyophilized product )	11 ml	X	1	vial
標 準 品 凍結乾燥品 ・	・ ml 用	×	・	・ ・ ・ ・
standard article (lyophilized product )	1 ml	X	1	vial
検体希釈液	・ ml	×	・	・ ・ ・ ・
test agent diluent	11 ml	X	2	vial

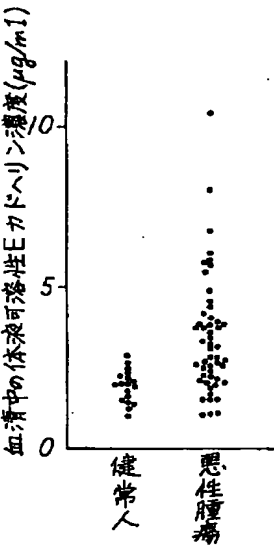






【図 2】

[Figure 2]



【図 3】

[Figure 3]

